ChinaXiv合作期刊

chinaXiv:201711.01757v1

全自动体外模拟瘤胃发酵系统：19 kPa 以下排气压力不影响发酵特征

龙栋磊[1,2] 文江南[1] 王 敏[2,3*] 王 荣[1] 张秀敏[3] 毛宏祥[1] 邓近平[1,4*] 谭支良[3]

（1.湖南农业大学动物科学技术学院，长沙 410128；2.湖南畜禽安全生产协同创新中心，长沙 410128；3.中国科学院亚热带农业生态研究所，长沙 410125；4.华南农业大学动物科学学院，广州 510640）

摘 要：本试验旨在研究不同排气压力对体外模拟瘤胃发酵特征的影响。选用 3 只体重相近、装有永久性瘤胃瘘管的成年湘东黑山羊作为瘤胃液供体动物，利用全自动体外模拟瘤胃发酵系统，选用 6 种发酵底物进行 48 h 体外发酵，研究 9、14 和 19 kPa 3 种排气压力对总产气量、甲烷产量、产气参数、干物质消失率、发酵液 pH 以及挥发性脂肪酸产量等发酵参数的影响。结果表明：发酵底物对体外模拟瘤胃发酵参数影响显著（$P<0.05$）；排气压力对体外模拟瘤胃发酵参数没有显著影响（$P>0.05$）。由此可见，排气压力由 9 kPa 增至 19 kPa 对体外模拟瘤胃发酵特征无影响。

关键词：排气压力；体外发酵；气体生成；挥发性脂肪酸

中图分类号：S816.6

瘤胃消化一直是反刍动物营养领域的研究重点，也是国内外研究热点。评价反刍动物饲料饲草营养价值的方法主要有体内法、半体内法和体外法，其中体外法又称人工瘤胃法。人工瘤胃法操作简单，省时省力，可以在较短时间内评价大量饲料饲草样品，而且基本不受动物数量限制，反应条件易于调控，重复性好，易于标准化，因而在反刍动物饲料饲草营养价值评价中得到了广泛应用[1-2]。

人工瘤胃法最早由 Raab 等[3]和 Menke 等[4]建立，是目前用来评价反刍动物饲料饲草营养价值的关键技术之一，并且他们最先将 100 mL 注射器应用于模拟瘤胃体外产气研究。随

收稿日期：2017-05-03

基金项目：国家自然科学基金项目(31561143009，31472133)；国家科技计划项目（2016YFD0500504)；湖南省科技计划项目(2015WK3043)；中国科学院青年促进会项目

作者简介：龙栋磊（1991－），男，湖南邵阳人，硕士研究生，从事反刍动物营养与繁殖研究。E-mail: 15073147518@163.com

*通信作者：王 敏，副研究员，E-mail： mang@isa.ac.cn；邓近平，研究员，博士生导师，E-mail： dengjinping@aliyun.com

chinaXiv:201711.01757v1

后压力传感器被应用于模拟瘤胃产气技术中，即借助压力传感器测定发酵瓶气体压力，采用特定软件记录发酵瓶压力来估算体外总产气[5]。科学家还研制出半自动定点实时记录系统[6-7]，即手动型或自动定点测定产气量和采集排气样品。近几年，随着计算机控制程序的引入，本研究团队研制了全自动体外模拟瘤胃发酵系统。

全自动体外模拟瘤胃发酵系统可对发酵瓶压力进行实时在线监测，到达一定压力时自动放气，所排放的气体进入气相色谱仪测定甲烷（CH_4）和氢气（H_2）等组分[8]。本系统进行体外模拟瘤胃发酵时，为满足足够的气体进入气相色谱仪测定气体组分，设定的排气压力一般是 9 kPa。在使用全自动体外模拟瘤胃发酵系统时每批次使用 40 个发酵瓶，但是系统每次只能允许 1 个发酵瓶排气进入气相色谱仪测定气体组分。所以，有些达到排气压力的发酵瓶只能等待之前发酵瓶排气结束之后再排气，这时等待排气的发酵瓶的压力会持续增加。当该系统 40 个发酵瓶同时达到排气压力时，最后排气的发酵瓶压力可达到 19 kPa 左右。这给本体外模拟瘤胃发酵系统带来了一个问题，即排气压力增加（9~19 kPa）会不会给本系统带来一个新的影响因子。

目前，国内外已有相关报告研究发酵瓶压力对体外模拟瘤胃发酵的影响。Theodorou 等[9]研究表明，当发酵瓶压力达到 48 kPa 时，瘤胃微生物受到抑制从而影响发酵特征。Cattani 等[10]研究表明，与固定排气压力（3.4 kPa）相比，固定时间排气导致发酵瓶压力增大（最高可达 23 kPa）进而增大发酵气体在发酵液中的溶解量，使得总产气量测定值偏低。但是，9~19 kPa 排气压力对体外模拟瘤胃发酵特征的影响目前还没有深入研究。因此，本试验利用自主研制的全自动体外模拟瘤胃发酵系统（专利号：ZL2014102054006），设置 9、14 和 19 kPa 的 3 个排气压力梯度，探究排气压力增加对体外模拟瘤胃发酵特征的影响。

1　材料与方法

1.1　试验供体动物及饲粮

选用 3 只成年、平均体重（20 ± 2.5） kg、雄性去势并装有永久性瘤胃瘘管的湘东黑山羊作为瘤胃液供体动物。试验动物基础饲粮由水稻秸秆和精料补充料组成，饲粮精粗比为 40:60，每天饲喂精饲料 200 g，粗饲料 300 g。山羊精饲料参照我国《肉羊饲养标准》（NY/T 816－2004）配制，精饲料组成为玉米 47%、豆粕 24%、麸皮 22%、食盐 0.77%、石粉 2.23%、预混料 4%。每只瘘管羊每天 08:00 和 16:00 各等量饲喂 1 次，试验期内，单笼饲养，自由

ChinaXiv合作期刊

饮水。

1.2 全自动体外模拟瘤胃发酵系统

本试验利用自主研发的全自动体外模拟瘤胃发酵系统进行体外发酵。本系统的设计理念、详细组成部分和运行方法可参考专利 ZL2014102054006 和 Wang 等[8]文献。简要介绍如下：本系统由发酵瓶恒温培养箱、压力测定系统、气体组分检测系统和计算机控制系统 4 部分组成，实现对发酵瓶压力实时在线监测，达到排气压力时自动释放发酵瓶压力，并测定发酵瓶排出气体组分。发酵瓶恒温培养箱主要模拟瘤胃环境，控制发酵瓶在接种后保持适宜温度（39.5 ℃）和一定的振荡频率（50 r/min）。压力测定系统由压力传感器（SMC，日本）和三通电磁阀（SMC，日本）组成，通过压力传感器可以在线监测发酵瓶压力，通过三通电磁阀可以控制发酵瓶适时排气。气体组分检测系统主要为气相色谱仪（安捷伦 7890A，美国），用来检测发酵产生气体中的 CH_4 等气体组分。计算机控制系统控制每个发酵瓶的排气压力，在计算机控制系统页面可以直观看到每个发酵瓶的实时压力和累积压力。模拟瘤胃发酵过程中，发酵瓶通过带针头的导管与三通电磁阀和压力传感器连接，压力传感器与计算机相连接。通过计算机设定三通电磁阀的排气压力并时刻记录发酵瓶压力。当发酵瓶压力达到设定排气压力时，发酵瓶进入排放等待序列。当该发酵瓶之前所有排气结束时，系统就自动打开该发酵瓶的三通电磁阀进行排气。排出气体通过气体导管进入气相色谱仪（安捷伦 7890A，美国），自动触发气相色谱仪工作，检测排放气体中的 CH_4 含量。利用 Wang 等[11]方法计算 CH_4 产量。

1.3 发酵底物及体外模拟瘤胃发酵

选用 6 种发酵底物，4 种粗饲料为菊苣、葛藤、阿巴豆叶和桑叶；2 种精饲料为玉米粉和次粉。发酵底物均经过风干、粉碎过 1 mm 筛片。试验前用分析天平准确称取 0.6 g 发酵底物加入到 150 mL 发酵瓶中。参照 Menke 等[4]的方法配制 2.4 L 人工瘤胃缓冲液。把配制好的人工瘤胃缓冲液置于恒温磁力搅拌器上加热使其保持在 39.5 ℃并持续通入纯二氧化碳（CO_2）2 h 左右，加入少量硫化钠以保证厌氧环境（以刃天青变成无色来判断）。

通过瘤胃瘘管采集 2 只晨饲前湘东黑山羊的新鲜瘤胃液于保温杯中，迅速带回实验室。将采集的瘤胃液用 6 层脱脂纱布过滤，量取 600 mL 迅速加入到准备好的 2.4 L 人工瘤胃缓冲液中（瘤胃液与人工瘤胃缓冲液体积比为 1:4），用磁力搅拌器搅拌以保持瘤胃液与缓冲液

chinaXiv:201711.01757v1

混合均匀，制成混合人工瘤胃培养液并保持温度 39.5 ℃。利用分液器准确移取 60 mL 人工瘤胃培养液依次加入到 150 mL 发酵瓶中，放入恒温培养箱中进行体外模拟瘤胃厌氧发酵。在全自动体外模拟瘤胃发酵系统上设定 9、14 和 19 Kpa 3 个排气压力。恒温培养箱设定温度为 39.5 ℃，振荡频率 50 r/min。

接种 48 h 后，通过操作系统使发酵瓶与压力传感器及气相色谱仪断开连接，迅速将发酵瓶从恒温培养箱取出终止发酵。取 2 mL 发酵液，在 25 100×*g*、4 ℃条件下离心 10 min 后，取 1 mL 上清液体，加入 0.1 mL 25%偏磷酸固定，静置 15 min 后，-20 ℃保存用于测定挥发性脂肪酸（volatile fatty acid，VFA）含量。剩余样品用于测定 pH 和体外干物质消失率（*in vitro* dry matter disappearance，IVDMD）。本试验做 3 个批次，每个批次瘤胃液来自 2 只不同瘘管羊。

1.4 样品测定

按照杨胜[12]确定的常规测定方法测定发酵底物的干物质（dry matter，DM）、粗蛋白质（crude protein，CP）、粗脂肪（ether extract，EE）、有机物（organic matter，OM）含量；依照 Hall 等[13]使用 Fibretherm FT12 全自动纤维仪（Gerhardt analytical systems, 德国）测定中性洗涤纤维（neutral detergent fiber，NDF）和酸性洗涤纤维（acid detergent fiber，ADF）含量。

用 pH 计（REX PHS－3C，上海仪器设备厂）迅速依次测定每个发酵瓶中发酵液的 pH。发酵液经纱布抽滤，将抽滤后的发酵底物用纱布包好再将其放置铝盒中，在 105 ℃烘箱中烘 8 h，称量并记录，计算 IVDMD。

挥发性脂肪酸含量测定方法参考 Wang 等[14]的方法。样品在常温下解冻，在 25 100×*g*、4 ℃条件下离心 10 min 后取 0.6 mL 上清液装于上机瓶中，利用气相色谱仪（安捷伦 7890A，美国）测定发酵液中的各 VFA 含量。

1.5 数据统计

应用非线性软件程序（NLREG），按照 Wang 等[15-16]提出的模型对体外模拟瘤胃发酵产气曲线进行拟合。模型及相关参数计算公式如下：

$$\mathrm{GP}_t = V_f \frac{1-\exp(-kt)}{1-\exp(b+kt)}$$。

式中：GP_t 表示 t 时刻的累积产气量（mL/g），V_f 表示潜在最大产气量（mL/g）；k 表示

chinaXiv:201711.01757v1

chinaXiv:201711.01757v1

产气速率（/h）；*b* 表示形状参数。

试验数据用 Excel 2010 进行初步整理后，采用 SPSS 21.0 统计软件中一般线性模型进行双因素方差分析，以检验排气压力、发酵底物及其交互作用的显著性差异。因统计结果显示排气压力和发酵底物间没有交互作用，交互作用的显著性差异没有列在表中。另外，本试验着重研究排气压力对体外发酵的影响，各发酵底物之间发酵参数的差异性不是本研究重点，对各底物的发酵特性没有做详细说明。统计结果的显著性差异定义为 $P<0.05$。

2 结 果

2.1 发酵底物特征

发酵底物营养成分如表 1 所示，6 种不同发酵底物营养成分差别很大，其中粗饲料的纤维（NDF 和 ADF）含量普遍高于精饲料。

表 1 发酵底物营养成分（干物质基础）

Table 1 Nutrient composition of fermentation substrates (DM basis) %

项目 Items	菊苣 Endive	葛藤 Kudo	阿巴豆叶 Abalone leaves	桑叶 Mulberry leaves	玉米粉 Corn flour	次粉 Wheat middling
干物质 DM	89.25	88.28	92.45	88.86	87.02	86.78
有机物 OM	85.98	88.72	95.82	89.53	97.67	98.99
粗蛋白质 CP	24.33	22.93	11.48	26.85	7.83	11.72
粗脂肪 EE	5.10	2.85	8.06	6.33	5.35	3.33
中性洗涤纤维 NDF	54.86	63.34	62.32	33.16	9.05	36.15
酸性洗涤纤维 ADF	42.68	29.43	35.44	19.76	3.12	12.05

2.2 不同排气压力对体外模拟瘤胃发酵总产气量的影响

以葛藤为例，不同排气压力下发酵瓶压力随发酵时间变化曲线如图 1 所示。设定的排气压力越大，达到排气所需的时间越长；设定的排气压力越小，排气次数越多。体外模拟瘤胃发酵 48 h 内，设定排气压力为 9、14 和 19 kPa 的发酵瓶分别排气 11、6 和 5 次。由图 1 可知，排气主要集中在发酵前期和中期，发酵前 36 h 排气 18 次，36~48 h 排气 4 次。

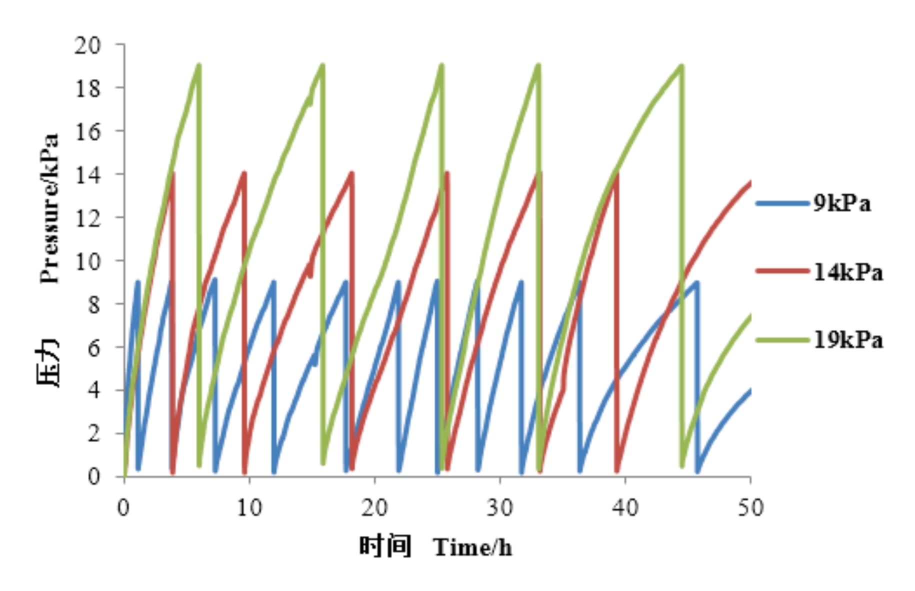


图 1　葛藤在不同排气压力下发酵瓶压力随发酵时间变化曲线

Fig.1　Variation curve of different venting pressure on pressure of bottle with fermentation time of kudo

由图 2 可知，把同一排气压力下 6 种底物发酵总产气量平均，得到不同排气压力下体外模拟瘤胃发酵总产气量随时间变化曲线。由图 2 可知，在发酵的前 12 h 内，气体生成曲线斜率最大，产气速率快，产气量迅速上升。但 3 种排气压力下气体生成曲线基本重合，没有明显差异。随着发酵时间延长，气体生成曲线斜率逐渐变小，产气速率趋于稳定。但由表 2 可知，发酵底物对体外模拟瘤胃发酵总产气量影响显著($P<0.05$)，但排气压力对体外模拟瘤胃发酵总产气量没有显著影响($P>0.05$)。

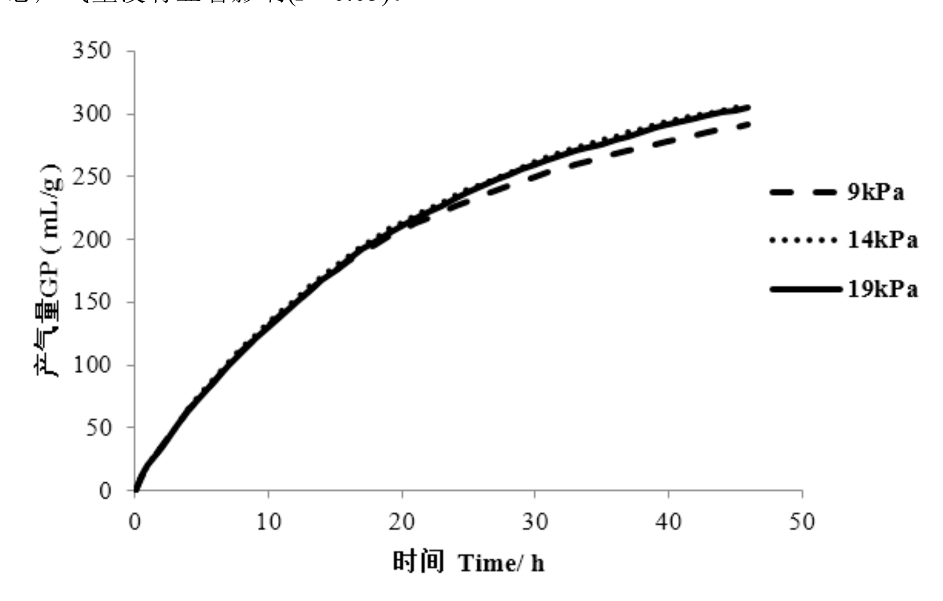


图 2　排气压力对体外模拟瘤胃发酵总产气量的影响（6 种底物发酵平均值）

Fig.2　Effects of venting pressure on total gas production of *in vitro* rumen fermentation

chinaXiv:201711.01757v1

（averaged value of six substrates）

2.3 排气压力对体外模拟瘤胃发酵 CH_4 生成的影响

不同排气压力下体外模拟瘤胃发酵 CH_4 产量及含量的曲线如图 3。由图 3 可知，不同的排气压力下 CH_4 生成曲线基本重合。但由表 3 可知，发酵底物对体外模拟瘤胃发酵 CH_4 产量影响显著($P<0.05$)，排气压力对体外模拟瘤胃发酵 CH_4 产量和产气速率没有显著影响($P>0.05$)。

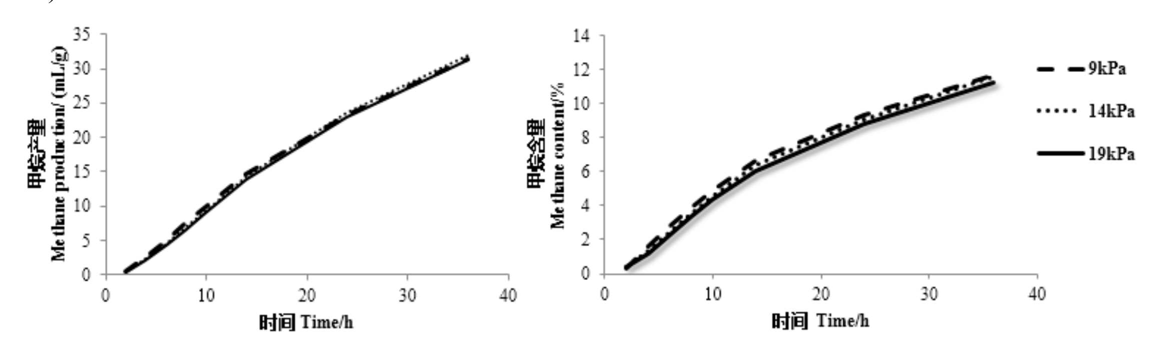


图 3　排气压力对体外模拟瘤胃发酵甲烷产量及含量的影响（6 种底物发酵平均值）

Fig.3　Effects of venting pressures on methane production and content of *in vitro* rumen fermentation　（averaged value of six substrates）

chinaXiv:201711.01757v1

ChinaXiv合作期刊

chinaXiv:201711.01757v1

表 2　排气压力对体外模拟瘤胃发酵总产气量的影响

Table 2　Effects of venting pressure on total gas production of *in vitro* rumen fermentation

项目 Items	排气压力 Venting pressure/kPa			标准误 SEM	发酵底物 Fermentation substrate						标准误 SEM	*P* 值 *P*-value	
	9	14	19		玉米粉 Corn flour	次粉 Wheat middling	桑叶 Mulberry leaves	阿巴豆叶 Abalone leaves	菊苣 Endive	葛藤 Kudo		排气压力 Venting pressure	发酵底物 Fermentation substrate
总产气量 Total gas production（mL/g DM）													
2 h	35.12	35.79	34.57	0.611	40.29	57.94	28.01	36.12	30.31	23.42	5.014	0.287	<0.05
4 h	63.39	64.59	63.08	0.798	76.04	109.75	49.79	63.64	50.51	40.51	10.275	0.560	<0.05
8 h	110.82	113.28	110.62	1.326	147.77	197.28	81.58	108.24	80.51	66.29	20.459	0.627	<0.05
14 h	167.09	170.03	167.25	1.653	267.79	278.23	119.44	152.55	114.32	93.61	33.200	0.233	<0.05
24 h	226.13	234.58	232.06	2.505	386.86	341.45	185.34	194.36	164.36	141.61	41.721	0.211	<0.05
36 h	268.39	282.07	279.12	4.157	443.44	384.94	242.46	228.46	211.74	184.61	43.015	0.205	<0.05

chinaXiv:201711.01757v1

表 3　排气压力对体外模拟瘤胃发酵甲烷产量的影响

Table 3　Effects of venting pressures on methane production of *in vitro* rumen fermentation

项目 Items	排气压力 Venting pressure/kPa			标准误 SEM	发酵底物 Fermentation substrate						标准误 SEM	*P* 值 *P*-value	
	9	14	19		玉米粉 Corn flour	次粉 Wheat middling	桑叶 Mulberry leaves	阿巴豆叶 Abalone leaves	菊苣 Endive	葛藤 Kudo		排气压力 Venting pressure	发酵底物 Fermentation substrate
甲烷产量 Methane production（mL/g DM）													
2 h	0.41	0.46	0.49	0.108	1.07	1.16	0.06	0.21	0.11	0.08	0.153	0.897	<0.05
4 h	2.59	2.27	2.04	0.225	3.18	6.65	0.84	1.99	0.68	0.44	0.319	0.242	<0.05
8 h	7.56	7.01	6.69	0.326	10.25	17.03	3.79	6.69	2.34	2.39	0.462	0.184	<0.05
14 h	14.74	14.41	13.86	0.358	23.29	27.52	9.09	13.01	6.49	6.61	0.507	0.223	<0.05
24 h	23.33	23.52	23.03	0.472	38.01	36.93	17.34	19.94	13.56	13.97	0.668	0.756	<0.05
36 h	31.31	31.94	31.31	0.508	48.49	45.59	26.61	26.56	20.73	21.27	0.718	0.635	<0.05
拟合参数 Fitting parameter													
潜在最大产气量 V_f/（mL/g）	37.57	38.87	38.44	0.698	52.45	50.56	36.75	34.19	27.85	27.96	0.497	0.727	<0.05
产气速率 k/h	0.95	0.66	0.62	0.863	1.74	-5.01	1.91	0.95	2.40	2.45	0.900	0.405	0.001
形状参数 b	0.10	0.10	0.10	0.008	0.13	0.09	0.09	0.08	0.11	0.11	0.010	0.999	0.018

ChinaXiv合作期刊

chinaXiv:201711.01757v1

表 4　排气压力对体外模拟瘤胃发酵干物质消失率、pH 及挥发性脂肪酸产量的影响

Table 4　Effects of venting pressure on IVDMD, pH and VFA production of *in vitro* rumen fermentation

项目 Items	排气压力 Venting pressure/kPa			标准误 SEM	发酵底物 Fermentation substrate						标准误 SEM	*P* 值 *P*-value	
	9	14	19		玉米粉 Corn flour	次粉 Wheat middling	桑叶 Mulberry leaves	阿巴豆叶 Abalone leaves	菊苣 Endive	葛藤 Kudo		排气压力 Venting pressure	发酵底物 Fermentation substrate
干物质消失率 IVDMD/%	0.69	0.68	0.68	0.010	0.93	0.83	0.69	0.52	0.66	0.48	0.071	0.534	<0.05
pH	6.79	6.78	6.78	0.016	6.57	6.73	6.94	6.89	6.87	6.94	0.060	0.637	<0.05
挥发性脂肪酸产量 VFA production/(mmol/L)	75.54	77.63	75.98	4.497	103.17	105.71	68.90	61.88	66.05	52.60	9.159	0.759	<0.05
VFA 各组分产量 Component production of VFA													
乙酸 Acetate/(mmol/L)	46.85	48.05	47.11	2.497	57.56	60.56	46.75	39.34	45.85	33.95	4.184	0.751	<0.05
丙酸 Propionate/(mmol/L)	17.28	17.80	17.34	1.012	27.74	25.91	13.30	14.10	12.21	11.58	2.988	0.738	<0.05
丁酸 Butyrate/(mmol/L)	7.78	8.04	7.88	0.874	13.21	13.43	5.49	5.60	5.20	4.50	1.720	0.852	<0.05
异丁酸 Isobutyrate/(mmol/L)	1.09	1.12	1.09	0.071	1.32	1.50	1.07	0.93	0.90	0.85	0.107	0.749	<0.05

戊酸 Valerate/(mmol/L)	1.72	1.78	1.73	0.140	1.72	2.84	1.22	1.05	0.99	0.89	0.302	0.808	<0.05
异戊酸 Isovalerate/(mmol/L)	1.10	1.10	1.12	0.063	1.62	1.47	1.07	0.86	0.90	0.82	0.139	0.650	<0.05
乙酸/丙酸 Acetate/propionate	2.95	2.92	2.94	0.069	2.07	2.35	3.54	2.79	3.90	2.96	0.283	0.781	<0.05

chinaXiv:201711.01757v1

chinaXiv:201711.01757v1

2.4 排气压力对体外模拟瘤胃发酵 IVDMD、pH、VFA 产量和组分和影响

由表 4 可知，发酵底物对体外模拟瘤胃发酵的 IVDMD、pH 及 VFA 产量和组分影响显著（$P<0.05$），排气压力对体外模拟瘤胃发酵的 IVDMD、pH 及 VFA 产量和组分没有显著影响（$P>0.05$）。

3 讨 论

瘤胃发酵产生的气体主要有 CO_2、CH_4 和 H_2。20 ℃、101.3 kPa 下，CH_4、H_2 和 CO_2 在纯水中溶解度分别为 33.1、18.2 和 878.0 mg/L。因此，CH_4 和 H_2 是难溶气体[17]，CO_2 是易溶气体。体外发酵产生的气体主要是 CO_2（>80%），瘤胃液中的溶解气体也主要是 CO_2。另外，CO_2 溶解度易受溶液温度、压力和 pH 等的影响[18]。排气压力可通过影响发酵液溶解 CO_2 含量和发酵瓶压力来影响体外模拟瘤胃发酵。

CO_2 在发酵液中有 2 种存在形式：1）以 CO_2 分子形式溶解在发酵液；2）在发酵液中形成碳酸（H_2CO_3）。其中，H_2CO_3 是 CO_2 在发酵液主要的存在形式，但其不稳定，容易电离成碳酸氢根（HCO_3^-）和氢离子（H^+），导致发酵液 pH 降低[19]。研究表明，溶解 CO_2 是影响发酵液酸碱的因素之一[20-21]。Counotte 等[22]研究表明，发酵液中 CO_2 含量增大使 CO_2 分压升高，进而显著降低瘤胃 pH。在本试验中，排气压力由 9 kPa 增至 19 kPa 没有显著改变发酵液 pH，这说明 19 kPa 以下排气压力不会改变发酵液 pH。

发酵瓶压力升高可影响体外模拟瘤胃发酵过程中的微生物活性。Theodorou 等[9]研究表明，当排气压力大于 48 kPa 时，瘤胃微生物活性受到抑制，进而减少瘤胃微生物对发酵底物的利用，发酵底物的 IVDMD 降低。本试验结果表明，排气压力由 9 kPa 增至 19 kPa 对 IVDMD 没有影响。结果说明，19 kPa 以下排气压力不足以直接影响瘤胃微生物的活性。

排气压力通过提高发酵瓶压力影响瘤胃液溶解 CO_2 是影响产气量的一个重要影响因子。当排气压力升高时，发酵瓶压力升高，溶解 CO_2 的含量增多，气体 CO_2 逸出减少，从而导致总气体产量偏低[9]。Tagliapietra 等[23]研究表明，固定时间排气方式产气量比固定压力产气量少。与固定压力（3.4 kPa）相比，固定时间排气压力可达 23 kPa，促进 CO_2 气体溶解，阻碍 CO_2 气体释放，致使总产气量测定值偏低。Lowman[24]研究表明，在 4.5 kPa 压力下，瘤胃液中 CO_2 不会出现过饱和现象。当排气压力低于 9 kPa 时，瘤胃液中 CO_2 的溶解度不会变化，但当排气压力大于 45 kPa 时，CO_2 溶解度增大，且促进 CO_2 在瘤胃液中产生更多碳

chinaXiv:201711.01757v1

酸盐[9]。本试验结果显示，排气压力由 9 kPa 增至 19 kPa 对总产气量没有影响。这说明，排气压力由 9 kPa 增至 19 kPa 对发酵液溶解 CO_2 含量影响较小。

甲烷菌可以利用 H_2 和 CO_2 合成 CH_4。当排气压力增加，瘤胃液中溶解 CO_2 含量增大，促进甲烷菌对溶解 CO_2 利用并生成更多 CH_4[25]。但是，发酵瓶压力过大，会抑制 CH_4 产量。Cattani 等[10]研究表明，大于 45 kPa 的排气压力会抑制甲烷菌活性从而减少 CH_4 产量。Wang 等[8]研究表明，45 kPa 排气压力虽然没有影响 CH_4 总产量，但降低 CH_4 生成速率。本试验结果显示，9~19 kPa 排气压力对 CH_4 产量没有影响。这说明，排气压力由 9 kPa 增至 19 kPa 不会直接影响甲烷菌活性从而影响 CH_4 产量。

瘤胃液中的溶解 CO_2 具有一个双重角色，既是基质又是产物[26]。瘤胃溶解 CO_2 通过控制微生物转录及羧酶和脱羧酶的活性，刺激一些瘤胃微生物生长和增殖，从而使这些瘤胃微生物达到一个最佳的生物合成和新陈代谢状态[27-29]。例如，琥珀酸合成受磷酸烯醇丙酮酸盐（PEP）和细胞质 CO_2 所调节[30]，研究表明，当在瘤胃液中溶解 CO_2 增大时（>100 mmol/L），琥珀酸产量将会达到最大[31]。琥珀酸是丙酸合成前体物[32]，可以促进丙酸生成，导致乙酸/丙酸比值降低。另外，溶解 CO_2 在溶液中形成碳酸盐。当瘤胃液中碳酸盐浓度增大时，微生物利用更多的 H_2 来用于生成 VFA，提高 VFA 产量[23]。但是，本试验结果显示，排气压力由 9 kPa 增至 19 kPa 对 VFA 的组成和产量没有影响。这说明，排气压力由 9 kPa 增至 19 kPa 不足以影响瘤胃微生物生成 VFA 途径。

4 结 论

综上所述，排气压力由 9 kPa 增至 19 kPa 对发酵液中的溶解 CO_2 含量影响较小，对发酵液 pH、IVDMD、总产气量和 VFA 产量和组成均没有显著影响。本试验条件下所设置的发酵瓶不同排气压力不会影响该自主研发的全自动模拟瘤胃发酵系统所获取试验数据的准确性。

参考文献：

[1] JOHNSON R R.Techniques and procedures for *in vitro* and *in vivo* rumen studies[J].Journal of Animal Science,1966,25(3):855–875.

[2] FUCHIGAMI M,SENSHU T,HORIGUCHI M.A simple continuous culture system for rumen

microbial digestion study and effects of defaunation and dilution rates[J].Journal of Dairy Science,1989,72(11):3070–3078.

[3] RAAB L,CAFANTARIS B,JILG T,et al.Rumen protein degradation and biosynthesis 1. A new method for determination of protein degradation in rumen fluid *in vitro*[J].British Journal of Nutrition,1983,50(3):569–582.

[4] MENKE K H,RAAB L,SALEWSKI A,et al.The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*[J].The Journal of Agricultural Science,1979,93(1):217–222.

[5] PELL A N,SCHOFIELD P.Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*[J].Journal of Dairy Science,1993,76(4):1063–1073.

[6] MAURICIO R M,MOULD F L,DHANOA M S,et al.A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation[J].Animal Feed Science and Technology,1999,79(4):321–330.

[7] CONE J W,VAN GELDER A H,BACHMANN H.Influence of inoculum source on gas production profiles[J].Animal Feed Science and Technology,2002,99(1/2/3/4):221–231.

[8] WANG M,WANG R,TANG S X,et al.Comparisons of manual and automated incubation systems:effects of venting procedures on *in vitro* ruminal fermentation[J].Livestock Science,2016,184:41–45.

[9] THEODOROU M K,WILLIAMS B A,DHANOA M S,et al.A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds[J].Animal Feed Science and Technology,1994,48(3/4):185–197.

[10] CATTANI M,TAGLIAPIETRA F,MACCARANA L,et al.*Technical note*:*In vitro* total gas and methane production measurements from closed or vented rumen batch culture systems[J].Journal of Dairy Science,2014,97(3):1736–1741.

[11] WANG M,JANSSEN P H,SUN X Z,et al.A mathematical model to describe *in vitro* kinetics of H_2 gas accumulation[J].Animal Feed Science and Technology,2013,184(1/2/3/4):1–16.

[12] 杨胜.饲料分析及饲料质量检测技术[M].北京:北京农业大学出版社,1993:58–64.

chinaXiv:201711.01757v1

[13] HALL M B,PELL A N,CHASE L E.Characteristics of neutral detergent-soluble fiber fermentation by mixed ruminal microbes[J].Animal Feed Science and Technology,1998,70(1/2):23–39.

[14] WANG M,SUN X Z,JANSSEN P H,et al.Responses of methane production and fermentation pathways to the increased dissolved hydrogen concentration generated by eight substrates in *in vitro* ruminal cultures[J].Animal Feed Science and Technology,2014,194:1–11.

[15] WANG M,TANG S X,TAN Z L.Modeling *in vitro* gas production kinetics:Derivation of Logistic–Exponential (LE) equations and comparison of models[J].Animal Feed Science and Technology,2011,165(3/4):137–150.

[16] WANG M,SUN X Z,TANG S X,et al.Deriving fractional rate of degradation of logistic-exponential (LE) model to evaluate early *in vitro* fermentation[J].Animal,2013,7(6):920–929.

[17] 黄建军,顾平,陆彩霞.气相色谱法测定水相中微量氢气[J].分析试验室,2008,27(S2):369–372.

[18] HILL G A.Measurement of overall volumetric mass transfer coefficients for carbon dioxide in a well-mixed reactor using a pH probe[J].Industrial & Engineering Chemistry Research,2006,45(16):5796–5800.

[19] LOERTING T,BERNARD J.Aqueous carbonic acid (H_2CO_3)[J].ChemPhysChem,2010,11(11):2305–2309.

[20] DIJKSTRA J,ELLIS J L,KEBREAB E,et al.Ruminal pH regulation and nutritional consequences of low pH[J].Animal Feed Science and Technology,2012,172(1/2):22–33.

[21] WANG Y X,MAJAK W,MCALLISTER T A.Frothy bloat in ruminants:cause,occurrence,and mitigation strategies[J].Animal Feed Science and Technology,2012,172(1):103–114.

[22] COUNOTTE G H M,VAN'T KLOOSTER A T,VAN DER KUILEN J,et al.An analysis of the buffer system in the rumen of dairy cattle[J].Journal of Animal Science,1979,49(6):1536–1544.

[23] TAGLIAPIETRA F,CATTANI M,BAILONI L,et al.*In vitro* rumen fermentation:effect of headspace pressure on the gas production kinetics of corn meal and meadow hay[J].Animal Feed

chinaXiv:201711.01757v1

chinaXiv:201711.01757v1

Science and Technology,2010,158(3/):197–201.

[24] LOWMAN R S.Investigations into the factors which influence measurements during *in vitro* gas production studies[D].Ph.D.Thesis.Edinburgh:University of Edinburgh,1998.

[25] PATRA A K,YU Z.Effects of gas composition in headspace and bicarbonate concentrations in media on gas and methane production,degradability,and rumen fermentation using *in vitro* gas production techniques[J].Journal of Dairy Science,2013,96(7):4592–4600.

[26] DIXON N M,KELL D B.The inhibition by CO_2 of the growth and metabolism of micro-organisms[J].Journal of Applied Bacteriology,1989,67(2):109–136.

[27] BAEZ A,FLORES N,BOLÍVAR F,et al.Simulation of dissolved CO_2 gradients in a scale-down system:A metabolic and transcriptional study of recombinant *Escherichia coli*[J].Biotechnology Journal,2011,6(8):959–967.

[28] BLOMBACH B,TAKORS R.CO_2–intrinsic product,essential substrate,and regulatory trigger of microbial and mammalian production processes[J].Frontiers in Bioengineering and Biotechnology,2015,3:108.

[29] BLOMBACH B,BUCHHOLZ J,BUSCHE T,et al.Impact of different CO_2/HCO_3^- levels on metabolism and regulation in *Corynebacterium glutamicum*[J].Journal of Biotechnology,2013,168(4):331–340.

[30] CHENG K K,ZHAO X B,ZENG J,et al.Biotechnological production of succinic acid:current state and perspectives[J].Biofuels,Bioproducts and Biorefining,2012,6(3):302–318.

[31] SONG H,LEE J W,CHOI S,et al.Effects of dissolved CO_2 levels on the growth of *Mannheimia succiniciproducens* and succinic acid production[J].Biotechnology and Bioengineering,2007,98(6):1296–1304.

[32] PRINS R A,VAN DER MEER P.On the contribution of the acrylate pathway to the formation of propionate from lactate in the rumen of cattle[J].Antonie van Leeuwenhoek,1976,42(1/2):25–31.

Automated Incubation System *in vitro*: Venting Pressure Less Than 19 kPa did Not Affect

Fermentation Characteristics

LONG Donglei[1,2] WEN Jiangnan[1] WANG Min[2,3*] WANG Rong[1] ZHANG Xiumin[3] MAO Hongxiang[1] DENG Jinping[1,4*] TAN Zhiliang[3]

（1. *College of Animal Science and Technology*, *Hunan Agricultural University*, *Changsha* 410128, *China*; 3. *Hunan Co-Innovation Center of Animal Production Safety, Changsha* 410128, *China*; 2. *Institute of Subtropical Agriculture*, *Chinese Academy of Sciences*, *Changsha* 410125, *China*; 4. *College of Animal Science*, *South China Agricultural University*, *Guangzhou* 510640, *China*）

Abstract: The present study was conducted to determine the effect of different venting pressure on *in vitro* fermentation characteristics. Rumen fluid was collected from three adult *Xiaongdong* black goats with similar weight and permanent rumen fistula, used automated incubation system *in vitro*, and six widely varied substrates were selected for 48 h *in vitro* fermentation, and three venting pressures (9, 14 and 19 kPa) were performed to investigate the effects of venting pressure on *in vitro* total gas production, methane production, *in vitro* dry matter disappearance, fermentation fluid pH and volatile fatty acid production et al. The results showed that fermentation substrate had significant effects on *in vitro* rumen fermentation parameters (P<0.05); however, venting pressure had no significant effects on *in vitro* fermentation parameters （P>0.05）. In conclusion, venting pressure increase from 9 kPa to 19 kPa do not affect fermentation characteristics.

Key words: venting pressure; *in vitro* fermentation; gas production; volatile fatty acids

---

*Corresponding authors: WANG Min, associate professor, E-mail： mang@isa.ac.cn; DENG Jinping, professor, E-mail： dengjinping@aliyun.com (责任编辑 武海龙)

chinaXiv:201711.01757v1